

L1 ANSWER 1 OF 1 WPINDEX COPYRIGHT 2008

THOMSON REUTERS on STN

Full
Text

AN 2002-077303 [11] WPINDEX
 CR 2002-077302
 DNC C2002-023270 [11]
 TI New bacteriocin, sakacine G, useful for controlling microbes, particularly Listeria monocytogenes, in foods, is derived from Lactobacillus sakei 2512
 DC D13; D16
 IN BERJEAUD J; BERJEAUD J M; CENATIEMPO Y; FREMAUX C; SIMON L; BERJEAUD J -
 PA (RHOD-C) RHODIA CHIM; (RHOD-C) RHODIA FOOD; (BERJ-I) BERJEAUD J; (CENA-I) CENATIEMPO Y; (FREM-I) FREMAUX C; (SIMO-I) SIMON L; (DANI-N) DANISCO AS
 CYC 95
 PIA FR 2809404 A1 20011130 (200211)* FR 29[1]
WO 2001092533 A1 20011206 (200211) FR
AU 2001064038 A 20011211 (200225) EN
EP 1285069 A1 20030226 (200319) FR
BR 2001011265 A 20030617 (200347) PT
CN 1436238 A 20030813 (200373) ZH
JP 2004504815 W 20040219 (200414) JA 55
US 20040214173 A1 20041028 (200471) EN
US 6855518 B2 20050215 (200513) EN
RU 2250267 C2 20050420 (200528) RU
US 20050232910 A1 20051020 (200569) EN
AU 2001264038 B2 20060202 (200656) EN
US 7238515 B2 20070703 (200746) EN
CN 1300317 C 20070214 (200749) ZH
EP 1927661 A2 20080604 (200837) FR
EP 1285069 B1 20080813 (200856) FR
DE 60135325 E 20080925 (200864) DE
EP 1927661 A3 20081015 (200868) FR
 ADT FR 2809404 A1 FR 2000-13407 20001019; AU 2001064038 A AU 2001-64038
20010528; AU 2001264038 B2 AU 2001-264038 20010528; BR 2001011265 A BR 2001-11265 20010528; CN 1436238 A CN 2001-811257 20010528; CN 1300317 C CN 2001-811257 20010528; DE 60135325 E DE 2001-60135325 20010528; EP 1285069 A1 EP 2001-938357 20010528; EP 1927661 A2 Div Ex EP 2001-938357 20010528;
EP 1285069 B1 EP 2001-938357 20010528; DE 60135325 E EP 2001-938357 20010528; US 7238515 B2 Div Ex US 2001-296723 20010528; WO 2001092533 A1 WO 2001-FR1642 20010528; EP 1285069 A1 PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; JP 20010528; BR 2001011265 A PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; JP 2004504815 W PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; US 20040214173 A1 PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; US 6855518 B2 PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; RU 2250267 C2 PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; US 20050232910 A1 Cont of WO 2001-FR1642 20010528; US 7238515 B2 Div Ex WO 2001-FR1642 20010528; EP 1285069 B1 PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; DE 60135325 E PCT Application WO 2001-FR1642 20010528; JP 2004504815 W JP 2002-500725 20010528; RU 2250267 C2 RU 2002-135601 20010528; US 20040214173 A1 US 2002-296723 20021126; US 6855518 B2 US 2002-296723 20021126; US 20050232910 A1 Cont of US 2002-296723 20021126; US 20050232910 A1 US 2005-28505 20050104; US 7238515 B2 US 2005-28505 20050104; EP 1927661 A2 EP 2008-101852 20010528; EP 1285069 B1 Related to EP 2008-101852 20080221; EP 1927661 A3 Div Ex EP 2001-938357 20010528; EP 1927661 A3 EP 2008-101852 20010528
 FDT EP 1927661 A2 Div ex EP 1285069 A; DE 60135325 E Based on EP 1285069 A; EP 1285069 B1 Related to EP 1927661 A; US 6855518 B; US 7238515 B2 Div ex US 6855518 B; AU 2001064038 A Based on WO 2001092533 A; EP 1285069 A1 Based on WO 2001092533 A; BR 2001011265 A Based on WO 2001092533 A; JP 2004504815 W Based on WO 2001092533 A; US 6855518 B2 Based on WO 2001092533 A; RU 2250267 C2 Based on WO 2001092533 A; AU 2001264038 B2 Based on WO 2001092533 A; EP 1285069 B1 Based on WO 2001092533 A; DE 60135325 E Based on WO 2001092533 A; EP 1927661 A3 Div ex EP 1285069 A
 PRAI FR 2000-6859 20000529

AN FR 2000-13407 20001019
2002-077303 [11] WPINDEX
CR 2002-077302

AB FR 2809404 A1 UPAB: 20060118

NOVELTY - Isolated polypeptide (I), designated sakacine G, is a bacteriocin from *Lactobacillus sakei* 2512.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

- (1) nucleic acid (II) that encodes (I);
- (2) cloning and/or expression vector containing (II);
- (3) host cell transformed with the vector of (2);
- (4) preparation of recombinant (I) by culturing cells of (3); and
- (5) composition comprising at least one (I) or *L. sakei* 2512.

ACTIVITY - Antibacterial. In a test on bacteria growing in gelled medium, (I) inhibited *Listeria ivanovii* BUG 496; *Listeria innocua* 8811; *Enterococcus durans*; *E. faecalis*; *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus sakei* 2515.

MECHANISM OF ACTION - None given in the source material.

USE - (I) is used to control pathogenic or unwanted microorganisms in food processing (claimed) and (not claimed) in medical, veterinary and cosmetic products, most particularly *Listeria monocytogenes*. (I) may be generated in foods by fermentation with *L. sakei* 2512.

ADVANTAGE - (I) is a particularly effective inhibitor of *Listeria monocytogenes*.

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) Nº de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 809 404

(21) Nº d'enregistrement national : 00 13407

(51) Int Cl⁷ : C 07 K 14/335, C 12 N 15/31, 15/63, A 23 L 3/3571, 3/
3526 // (C 12 N 15/31, C 12 R 1:225)

(12)

BREVET D'INVENTION

B1

(51) BACTERIOCINE ANTI-LISTERIA.

(22) Date de dépôt : 19.10.00.

(30) Priorité : 29.05.00 FR 00006859.

(60) Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

(71) Demandeur(s) : RHÔDIA FOOD Société par actions
simplifiée — FR.

(43) Date de mise à la disposition du public
de la demande : 30.11.01 Bulletin 01/48.

(45) Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 30.08.02 Bulletin 02/35.

(72) Inventeur(s) : BERJEAUD JEAN MARC, FREMAUX
CHRISTOPHE, GÉNATIEMPO YVES et SIMON
LAURENCE.

(66) Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

(73) Titulaire(s) : RHODIA CHIMIE.

(74) Mandataire(s) : CABINET LAVOIX.

FR 2 809 404 - B1



La présente invention concerne une bactériocine de *Lactobacillus sakei* et plus particulièrement de *Lactobacillus sakei* 2512, une séquence nucléotidique codant pour cette bactériocine, et l'utilisation industrielle de cette bactériocine comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation de produits alimentaires.

Les bactéries lactiques sont utilisées intensivement dans les fermentations alimentaires afin, non seulement d'améliorer la saveur et la texture des aliments mais surtout pour allonger leur durée de conservation. De nombreuses bactéries lactiques ont en effet la faculté d'inhiber la croissance de certaines bactéries à 10 Gram positif, dont des souches pathogènes comme *Listeria monocytogenes*, grâce à l'excrétion de molécules antagonistes, parmi lesquelles des composés peptidiques. Ces composés peptidiques, appelés bactériocines, présentent donc un potentiel intéressant pour la préservation qualitative et sanitaire de produits alimentaires fermentés.

15 A titre représentatif de ces bactériocines, on peut notamment citer celles formant la sous-classe de polypeptides dénommés bactériocines anti-*Listeria*, bactériocines de classe IIa (Ennahar S. et al., 2000, FEMS Microbiol. Rev., 24 :85-106) et cystibiotiques (Jack R. et al., 1995, Microbiol. Rev., 59(2) :171-200). Il a été fait récemment état de l'utilisation potentielle d'une de ces 20 bactériocines de classe IIa, la divercine V41, pour empêcher la croissance de *Listeria monocytogenes* dans du saumon fumé (Duffes F. et al., 1999, J. Food Prot., 62(12) :1394-1403).

Les séquences de ces polypeptides présentent de fortes similitudes dans leur partie N-terminale, avec en particulier la présence d'un pont disulfure. La 25 partie C-terminale hydrophobe est beaucoup plus variable, toutefois certains de ces bactériocines, dites de type pédiocine (pédiocine PA-1, entérocine A et divercine V41), se caractérisent par une taille supérieure à 40 résidus et la présence d'un deuxième pont disulfure du côté C-terminal.

Les auteurs de la présente invention ont mis en évidence une nouvelle 30 bactériocine de classe IIa produite à partir d'une souche spécifique de

Lactobacillus sakei, qui s'avère particulièrement efficace pour inhiber la croissance de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*.

En accord avec Tagg J.R. et al., Bacteriol. Rev., 40 ; 722-756 (1976), le terme "Bactériocine" au sens de l'invention fait référence à un polypeptide produit, par synthèse ribosomique, à partir de microorganismes, capable d'inhiber spécifiquement la croissance d'autres bactéries.

La présente invention a donc pour premier objet un polypeptide issu de la souche *Lactobacillus sakei* 2512, doté d'une activité bactériocine.

10 La souche *Lactobacillus sakei* 2512 a été déposée le 25 mai 2000 auprès de la Collection Nationale des Cultures de Microorganismes où elle est enregistrée sous le numéro de dépôt I - 2479.

La bactériocine objet de la présente invention a été dénommée Sakacine G. Il s'agit d'un polypeptide possédant une masse moléculaire de l'ordre de 3700 à 3900 et préférentiellement d'environ 3834 Da déterminée par spectrométrie de masse. Elle possède un spectre d'inhibition bactérienne très apparenté à celui des bactériocines de classe IIa. C'est ainsi qu'elle s'avère particulièrement efficace contre les souches de *Lactobacillus sakei* autres que le *Lactobacillus sakei* 2512, *Pediococcus cerevisiae*, l'ensemble des souches *Listeria* et contre les 15 *Enterococcus faecalis* et *durans*. En revanche, elle s'avère inactive contre les autres espèces de *Lactobacillus* comme par exemple le *Lactobacillus debrueckii*, le *Lactobacillus plantarum*, le *Lactobacillus brevis*, le *Lactobacillus casei*, et une 20 souche d'*Enterococcus fascium*.

A l'image des bactériocines anti-*Listeria* de type pédiocine, la Sakacine 25 G possède dans sa structure peptidique avantageusement deux ponts disulfures.

Une analyse des déterminants génétiques de plusieurs bactériocines de classe IIa a montré que les gènes impliqués dans leurs production, transport et immunité, sont organisés en une ou plusieurs structures de type opéron. Ces opérons ont une localisation souvent plasmidique et possèdent généralement au 30 moins deux gènes codant pour des protéines, homologues à un ABC-transporteur

et une protéine accessoire, probablement impliquée dans l'export des bactériiocines.

Le clonage du fragment nucléotidique (SEQ ID N° 9) contenant le gène de la Sakacine G a révélé l'existence de deux cadres ouverts de lecture complets 5 *skgA1* (SEQ ID N°1) et *skgA2* (SEQ ID N°3) et de deux autres tronqués *skgI* (SEQ ID N°5) et *skgD* (SEQ ID N°7) situés aux deux extrémités du fragment cloné dont une représentation schématique est présentée en figure 1.

Les produits des gènes *skgA1* et *skgA2*, appelés pré-bactériiocines, peuvent subir une maturation au cours de laquelle leurs peptides leaders respectifs 10 sont clivés entre les résidus 18 et 19, libérant ainsi la Sakacine G active (résidus 19-55).

La présente invention a donc également pour objet un polypeptide isolé correspondant à une bactériocine, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°2 et/ou la séquence ID N°4. La séquence de la bactériocine mature comprend la 15 séquence ID N°12.

Le cadre de lecture appelé *skgI* code une protéine de 54 résidus. La comparaison de cette séquence avec celle des banques de données montre de fortes similitudes de SkgI avec des protéines dites d'immunité. Elle code vraisemblablement pour la protéine d'immunité protégeant la bactérie productrice 20 de la Sakacine G.

La présente invention s'étend également à un polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°6 correspondant au cadre de lecture *skgI*.

En ce qui concerne le dernier gène *skgD*, il code pour une portion de protéine qui présente une homologie avec des protéines de la famille des ABC-25 transporteurs, et plus particulièrement du transporteur de la pédiocine PA-1. Le gène *skgD* code vraisemblablement pour l'ABC-transporteur spécifique de la Sakacine G.

La présente invention s'étend également au polypeptide isolé comprenant la séquence ID N°8 correspondant à ce gène dit *skgD*.

30 Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues, définies comme

i) les séquences similaires à au moins 70% de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8 ou N° 12 ; ou

ii) les séquences codées par une séquence d'acide nucléique homologue telle que définie ci-après c'est-à-dire une séquence d'acide nucléique 5 hybrideant avec la séquence SEQ ID N° 1, N° 3, N° 5, N° 7 ou N° 9 ou sa séquence complémentaire, dans des conditions stringentes d'hybridation.

Là encore, le terme "similaires" se réfère à la ressemblance parfaite ou identité entre les acides aminés des séquences homologues comparées mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de 10 similitudes dans une séquence polypeptidique prend en compte les substitutions conservatives qui sont des substitutions d'acides aminés de même classe, telles que des substitutions d'acides aminés aux chaînes latérales non chargées (tels que l'asparagine, la glutamine, la serine, la thréonine, et la tyrosine), d'acides aminés aux chaînes latérales basiques (tels que la lysine, l'arginine, et l'histidine), d'acides 15 aminés aux chaînes latérales acides (tels que l'acide aspartique et l'acide glutamique) ; d'acides aminés aux chaînes latérales apolaires (tels que la glycine, lalanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la proline, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane, et la cystéine).

Plus généralement, par "séquence d'acides aminés homologue", on 20 entend donc toute séquence d'acides aminés qui diffère de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8 ou N° 12 par substitution, délétion et/ou insertion d'un acide aminé ou d'un nombre réduit d'acides aminés, notamment par substitution d'acides aminés naturels par des acides aminés non naturels ou pseudo-acides aminés à des positions telles que ces modifications ne portent pas 25 significativement atteinte à l'activité biologique du polypeptide isolé et de préférence de la Sakacine G.

De préférence, une telle séquence d'acides aminés homologue est similaire à au moins 85 % de la séquence SEQ ID N° 2, N° 4, N° 6, N° 8 ou N° 12, de préférence au moins 95 %.

30 L'homologie est généralement déterminée en utilisant un logiciel d'analyse de séquence (par exemple, Sequence Analysis Software Package of the

Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Des séquences d'acides aminés similaires sont alignées pour obtenir le maximum de degré d'homologie (i.e. identité ou similitude, comme défini plus haut). A cette fin, il peut être nécessaire 5 d'introduire de manière artificielle des espaces ("gaps") dans la séquence. Une fois l'alignement optimal réalisé, le degré d'homologie est établi par enregistrement de toutes les positions pour lesquelles les acides aminés des deux séquences comparées sont identiques, par rapport au nombre total de positions.

10 L'activité biologique du polypeptide isolé et notamment de la Sakacine G se réfère à sa capacité à inhiber la croissance de souches bactériennes indésirables et/ou pathogènes, de préférence de bactéries *Listeria* et plus particulièrement de bactéries *Listeria monocytogenes*.

15 La présente invention a également pour objet un acide nucléique isolé, codant pour un polypeptide tel que défini précédemment.

Plus précisément, la présente invention a pour objet un acide nucléique isolé comprenant la séquence ID N°1 et/ou la séquence ID N°3.

20 La séquence nucléotidique complète de la région impliquée dans l'expression de la Sakacine G (2042 pb) a été déterminée, et est représentée en séquence ID N°9. La présente invention vise également un acide nucléique comprenant une telle séquence.

25 Comme décrit précédemment, cette séquence possède deux cadres ouverts de lecture complets *skgA1* et *skgA2* et de deux autres tronqués, *skgI* et *skgD* situés aux deux extrémités du fragment cloné. Les gènes supposés *skgA1* (SEQ ID N°1), *skgA2* (SEQ ID N°3) et *skgI* (SEQ ID N°5) y sont orientés en sens inverse par rapport à *skgD* (SEQ ID N°7).

Sont également revendiqués dans le cadre de la présente invention, l'acide nucléique comprenant la séquence ID N°5 ainsi que l'acide nucléique comprenant la séquence ID N°7.

30 Il est entendu que sont également comprises les séquences homologues, définies comme :

- i) des séquences similaires à au moins 70 % de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 ; ou
- ii) des séquences hybrideant avec la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 ou leur séquence complémentaire, dans des conditions 5 stringentes d'hybridation, ou
- iii) des séquences codant pour le polypeptide dénommé Sakacine G, tel que défini précédemment.

De préférence, une séquence nucléotidique homologue selon l'invention est similaire à au moins 75 % des séquences SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9, 10 de préférence encore au moins 85 %, ou au moins 90 %.

De manière préférentielle, une telle séquence nucléotidique homologue hybride spécifiquement aux séquences complémentaires de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 dans des conditions stringentes. Les paramètres définissant les conditions de stringence dépendent de la température à laquelle 15 50% des brins appariés se séparent (T_m).

Pour les séquences comprenant plus de 30 bases, T_m est définie par la relation (Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory) :

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%G+C) + 16,6 \text{ Log}(concentration en cations) - 0,63(\%\text{formamide}) - (600/\text{nombre de bases})$$

20 Pour les séquences de longueur inférieure à 30 bases, T_m est définie par la relation :

$$T_m = 4(G+C) + 2(A+T).$$

Dans des conditions de stringence appropriées, auxquelles les séquences 25 aspécifiques n'hybrident pas, la température d'hybridation peut être de préférence de 5 à 10°C en dessous de T_m , et les tampons d'hybridation utilisés sont de préférence des solutions de force ionique élevée telle qu'une solution 6xSSC par exemple.

Le terme "séquences similaires" employé plus haut se réfère à la 30 ressemblance parfaite ou identité entre les nucléotides comparés mais aussi à la ressemblance non parfaite que l'on qualifie de similitude. Cette recherche de similitudes dans les séquences nucléiques distingue par exemple les purines et les

pyrimidines.

Une séquence nucléotidique homologue aux cadres ouverts de lecture représentés en SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 inclut donc toute séquence nucléotidique qui diffère de la séquence SEQ ID N°1, N°3, N°5, N°7 ou N°9 par 5 mutation, insertion, délétion ou substitution d'une ou plusieurs bases, ou par la dégénérescence du code génétique, pour autant qu'elle code pour un polypeptide présentant l'activité biologique de la Sakacine G, comme définie ci-après.

Parmi de telles séquences homologues, sont comprises les séquences des gènes de bactéries autres que *Lactobacillus*, codant pour la Sakacine G.

10 Les polypeptides de la présente invention peuvent être synthétisés par toutes les méthodes bien connues de l'homme du métier. Les polypeptides de l'invention peuvent par exemple être synthétisés par les techniques de la chimie de synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires 15 non désirés et pour sa facilité de production.

La présente invention a également pour objet un procédé de production d'un polypeptide recombinant dans lequel un vecteur comprenant un acide nucléique conforme à la présente invention est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression d'un polypeptide 20 conforme à la présente invention ou d'un polypeptide codé par une séquence d'acide nucléique conforme à la présente invention.

La bactériocine recombinante peut également être produite par un procédé, dans lequel, un vecteur contenant un acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique conforme à l'invention et de préférence les séquences 25 SEQ ID N°1 et/ou N°3 où une séquence homologue est transférée dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression du polypeptide correspondant. La protéine produite peut ensuite être récupérée et purifiée. Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant obtenu peut être purifié à partir de lysats et extraits 30 cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de

chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, etc.

La séquence d'acide nucléique d'intérêt, codant pour la Sakacine G, peut 5 être insérée dans un vecteur d'expression, dans lequel elle est liée de manière opérante à des éléments permettant la régulation de son expression, tels que notamment des promoteurs, activateurs et/ou terminateurs de transcription. Les signaux contrôlant l'expression des séquences nucléotidiques (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte 10 cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à réplication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes 15 standard, telles que par exemple l'électroporation ou la précipitation au phosphate de calcium.

Les vecteurs de clonage et/ou d'expression tels que décrits ci-dessus, contenant une séquence nucléotidique définie selon l'invention font également partie de la présente invention.

20

L'invention vise en outre les cellules hôtes transformées, de manière transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes, de préférence procaryotes, 25 d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transférée.

Des exemples de cellules hôtes incluent notamment des bactéries telles que *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Escherichia* et les levures.

30

Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par

criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base des séquences SEQ ID N°1, N°3, N°5, et/ou N°7 ou N°9. De telles banques peuvent être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

5 Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

10 La présente invention se rapporte également à un procédé pour inhiber la croissance de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes* dans un environnement qui peut être alimentaire ou non et qui est susceptible d'être contaminé avec les *Listeria monocytogenes*.

15 Les *Listeria monocytogenes* sont des microorganismes pathogènes qui sont à l'origine de sévères maladies chez les êtres humains et animaux et qui peuvent notamment être facilement transmissibles par des aliments contaminés, plus spécialement au moyen de viandes, de produits carnés, de produits marins, de lait et de produits dérivés. La présente invention propose donc un procédé pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes* dans un aliment susceptible de 20 contenir des *Listeria monocytogenes* à titre de contaminant, ledit procédé comprenant l'addition d'un polypeptide conforme à l'invention dans ledit aliment en une quantité suffisante pour inhiber la croissance de *Listeria monocytogenes*.

25 Les bactériocines conformes à l'invention sont de préférence utilisées dans tout système alimentaire en une quantité comprise entre 1 et 100000 unités arbitraires (AU) de bactériocines par gramme d'aliment.

Une AU de bactériocines est définie comme 5 µl de la dilution la plus élevée du surnageant de culture conduisant à une zone définie d'inhibition de croissance par rapport à une souche témoin d'une bactérie à Gram positif sur un milieu agar.

30 Bien que les aliments soient les plus concernés par une contamination par *Listeria monocytogenes*, les produits vétérinaires et médicaux peuvent également

être contaminés avec ce type de bactéries, de même que les produits cosmétiques ou produits apparentés.

Les bactériocines conformes à la présente invention, et notamment la Sakacine G, sont donc également utiles pour inhiber la croissance de ce type de 5 pathogènes dans ces produits.

La présente invention a ainsi pour objet l'utilisation d'une bactériocine conforme à la présente invention comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables notamment dans la préparation de produits alimentaires et plus précisément pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus 10 particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans les produits alimentaires.

Le polypeptide peut être incorporé tel quel dans le produit alimentaire considéré ou encore y être produit à partir de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

La présente invention a ainsi également pour objet l'utilisation de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 dans un produit alimentaire pour y générer un 15 polypeptide bactériocine conforme à l'invention.

L'invention concerne encore une composition bactériocine, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide conforme à la présente invention, c'est-à-dire issue de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 ou comprenant la séquence SEQ ID N°2, ou N°4, ou N°12 ou la souche *Lactobacillus Sakei* 2512.

20 L'invention s'étend également à l'utilisation de la souche *Lactobacillus sakei* 2512 destinée à produire un polypeptide tel que défini plus haut, pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans des produits alimentaires ainsi que les compositions comportant de telle souche.

25

Les exemples et la figure ci-après sont présentés à titre illustratif et non limitatif de l'objet de la présente invention.

FIGURE :

Figure 1 : Représentation schématique du locus génétique impliqué dans la production de la sakacine G.

5

MATERIELS ET METHODES

• Souches bactériennes et milieux de culture. *Lactobacillus sakei* 2512 est cultivée à 30°C en milieu MRS (DIFCO Laboratories) stérilisé 12 min à 110°C. Les souches indicatrices sont cultivées en milieu BHI ("brain-heart infusion"; DIFCO Laboratories) à 37°C.

10 15 • Test d'activité. Du milieu BHI, gélosé à 10g/l, est ensemencé à 1% par une préculture de souche indicatrice en phase stationnaire avant d'être coulé en boite de Petri. Cinquante microlitres de solution de sakacine G sont déposés dans des puits creusés dans la gélose refroidie à l'emporte pièce. L'activité bactériocine se traduit par l'apparition de zones d'inhibition autour des puits après incubation une nuit à 37°C.

20 25 • Analyse protéique. La sakacine G est analysée en spectrométrie de masse sur un appareil Perkin-Elmer Sciex API 165 équipé d'une source d'ionisation par Ionspray. Après lyophilisation, la fraction HPLC active est reprise avec une solution acétonitrile / eau (1:1) contenant 0,1% d'acide formique puis injectée par infusion à un débit de 5 µl/min.

La concentration protéique est déterminée par la méthode à l'acide bicinchoninique au moyen du kit BCA (Sigma) selon les instructions du fabricant.

Les comparaisons de séquences protéiques sont réalisées grâce au programme BLAST (1), accessible à partir du serveur ExPASy du "Swiss Institute of Bioinformatics".

30 • Clonage moléculaire et transformation. Les plasmides sont extraits et purifiés à partir de souches d'*Escherichia. coli* et de *Lactobacillus sakei* 2512 selon les méthodes décrites précédemment par Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold

Spring Harbor Laboratory et Muriana et Klaenhammer, 1987, Appl. Environ. Microbiol, 53 :553-560 respectivement.

Les enzymes de restriction et de modification de l'ADN sont utilisées selon les indications du fournisseur (Gibco-BRL). Les électrophorèses en gel 5 d'agarose, analytique et préparative, sont conduites en tampon Tris/borate/EDTA (pH 8,3) selon les méthodes décrites par Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory. Les fragments d'ADN digérés sont purifiés à partir des gels d'agarose en utilisant le kit "Prep-a-Gene" (Bio-Rad). Les clonages dans les 10 plasmides pGEM-T (Promega) et pZERO2 (Invitrogen) sont réalisés selon les recommandations des fournisseurs. Le transfert de type Southern est réalisé sur membrane de nylon (Hybond-N+, Amersham) selon Sambrook *et al.*, 1989, NY : Cold Spring Harbor Laboratory. Le transfert est suivi d'une hybridation avec une 15 sonde radioactive obtenue par marquage au ^{32}P à l'aide du kit "random primers DNA labelling system" (Gibco-BRL). Les bactéries *E. coli* sont rendues compétentes et transformées selon la méthode de Hanahan, 1983. J. Mol. Biol. 166:557-80.

La Taq polymérase (Gibco-BRL) est utilisée selon les recommandations du fournisseur. L'amplification du fragment d'ADN codant la Sakacine G a été réalisée à l'aide d'un appareil "Geneamp 9700®" (Perkin-Elmer) selon les 20 conditions suivantes : 35 cycles de dénaturation à 94°C pendant 30 s, hybridation à 45°C pendant 30 s et élongation à 72°C pendant 1 min suivis d'un cycle supplémentaire d'élongation à 72°C pendant 5 min.

Le fragment d'ADN portant le locus sakacine G est séquencé à l'aide d'un 25 séquenceur automatique ABI Prism 310® (Perkin-Elmer) en utilisant le kit de séquençage "Big-dye terminator®" (Perkin-Elmer) et les amorces nucléotidiques appropriées.

EXEMPLE 1 :

Isolement et purification de la Sakacine G.

30 Une culture de 16 h de *Lactobacillus. sakei* 2512 (100 ml) est centrifugée à 6000g pendant 15 min. Le surnageant de culture est ensuite chauffé à 70°C

pendant 20 min. Le surnageant refroidi est ensuite dilué avec 1 volume d'eau (le pH de la solution diluée doit être inférieur à 6, par addition d'HCl 1M si nécessaire) avant d'être passé sur une colonne (2,5 x 18 cm) contenant une résine échangeuse de cations (carboxy-méthyl cellulose; Cellufine C-200, Amicon)

5 5 équilibrée avec de l'eau. Après des lavages successifs avec de l'eau (100 ml) puis une solution de NaCl 0,1M (150 ml), la Sakacine G est élueée avec une solution de NaCl 0,5M (200 ml). Le pH de toutes les solutions doit être inférieur à 6. La fraction active est ensuite déposée sur cartouche d'extraction en phase solide (Sep-pak plus C18, Waters) équilibrée dans l'eau. Après lavages successifs avec 5 ml de

10 10 solutions d'acétate d'ammonium 20 mM contenant 0, 10, 20 et 30% d'acétonitrile, la Sakacine G est élueée avec 10 ml d'acétate d'ammonium 20 mM contenant 80% d'acétonitrile. Après lyophilisation, l'extrait est solubilisé dans 1 ml de solution aqueuse d'acétonitrile à 40% puis injecté sur une colonne HPLC analytique de phase inverse en C8 (Kromasil, 5µm, 100 Å, 4,6 x 250 mm, A.I.T.). L'HPLC a été

15 15 réalisée sur un appareillage comprenant une pompe Perkin-Elmer series 200 LC connectée à un détecteur Perkin-Elmer 785A. Le chromatogramme en absorption est enregistré à 220 nm. La séparation est réalisée, à un débit de 0,8 ml/min selon le gradient suivant : Solvant A = eau/acide trifluoroacétique 0,1%; solvant B = acétonitrile/eau/ acide trifluoroacétique 0,07%. Après un lavage de 5 min avec

20 20% de solvant B, l'élution est réalisée par un gradient de 20 de 40% de solvant B en 10 min puis de 40 à 55% de solvant B en 20 min.

La fraction correspondant au pic à 23 min s'étant révélée active contre *Listeria ivanovii* BUG 496 a été analysée en spectrométrie de masse en ionisation "ionspray". La molécule apparaît pure à au moins 95% et possède une masse moléculaire de $3834,32 \pm 0,31$ Da. La quantité de Sakacine G ainsi purifiée a été estimée à 120 µg à partir de 100 ml de culture. Le rendement de purification a été estimé à 55% d'activité retrouvée. Une partie de la séquence primaire de la Sakacine G a été déterminée par microséquençage et deux oligonucléotides dégénérés ont été établis à partir de cette séquence.

EXEMPLE 2 :

Clonage du locus génétique impliqué dans la production de la sakacine

G.

5 Par génétique inverse, les deux oligonucléotides dégénérés SakG01
(5' AARTATTATGGNAAYGGNGT 3') (SEQ ID N°10) et SakG02
(5' ACATGATGNCCNCCRTTNGC 3') (SEQ ID N°11) ont été choisis afin
d'amplifier le fragment d'ADN correspondant au gène de structure de la Sakacine
G mature (SEQ ID N°12) par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

10 L'amplifiat ainsi obtenu, d'une taille approximative de 100 pb a été cloné dans le
plasmide pGEM-T pour former le plasmide pJMBYC01. Le fragment de
restriction *Pvu*II de 560 pb issu de pJMBYC01, incluant le fragment inséré, a
servi de sonde d'hybridation, lors d'un transfert de type Southern, pour localiser le
gène de structure sur le génome de *Lactobacillus sakei* 2512. A partir d'un extrait
15 plasmidique de *Lactobacillus sakei* 2512 digéré par les enzymes de restriction
*Hind*III et *Eco*RI, la sonde a révélé des fragments de tailles respectives d'environ
2,1 et 9 kpb. Le fragment *Hind*III de 2,1 kpb a été purifié puis inséré dans le
vecteur pZERO2 pour donner le plasmide pJMBYC02. La présence du gène de
structure de la Sakacine G dans pJMBYC02 a été démontrée par amplification
20 PCR avec les amores SakG01 et SakG02 puis par séquençage nucléotidique du
fragment inséré dans pJMBYC02.

La séquence nucléotidique complète (2042 pb) du fragment de restriction
*Hind*III inséré dans pJMBYC02 a été déterminée. L'analyse de cette séquence a
révélé l'existence de deux cadres ouverts de lecture complets *skgA1* et *skgA2* et de
25 deux autres tronqués, *skgI* et *skgD* situés aux deux extrémités du fragment cloné.
Les gènes supposés *skgA1* *skgA2* et *skgI* sont orientés en sens inverse par rapport à
skgD.

Chacun des cadres ouverts de lecture est précédé d'un site potentiel de
fixation des ribosomes. Les gènes *skgA1* et *skgA2* codent tous les deux des
30 protéines de 55 résidus d'acides aminés dont les séquences 19-55 sont totalement
identiques. La séquence 19-52 correspond à la séquence de la sakacine G obtenue

par microséquençage. La présence supposée de 3 résidus cystéine en positions 9, 14 et 24 est confirmée et trois résidus supplémentaires de glycine, valine et cystéine apparaissent en extrémité C-terminale.

Les séquences 1-18 des protéines SkgA1 et SkgA2 ne diffèrent que de 3 résidus et présentent de fortes similitudes avec les peptides "leader" des bactériocines de classe II, qui sont impliquées dans le transport de ces peptides par des ABC-transporteurs spécifiques. En particulier le motif GG terminal (17-18) est caractéristique de ces séquences leader et constitue le site de maturation de ces bactériocines. La comparaison des séquences nucléotidiques des gènes *skgA1* et *skgA2* montre également une identité de séquence de plus de 95% pour la partie des gènes codant la bactériocine mature. Le cadre de lecture ouvert incomplet appelé *skgI* code une protéine de 54 résidus. La comparaison de cette séquence avec celles des banques de données montre de fortes homologies de SkgI avec les protéines dites d'immunité LccI et MesI. L'implication de MesI dans la protection vis à vis de la mésentéricine Y105 a été démontrée. On peut supposer que *skgI* code la protéine d'immunité à la sakacine G.

Le dernier gène *skgD* code une portion de protéine de 394 acides aminés. D'après les banques de données, SkgD est très homologue de protéines de la famille des ABC-transporteurs et plus particulièrement des transporteurs de la pédiocine PA-1 : PedD ou PapD (Marugg J.D. *et al.*, 1992, Appl. Environ. Microbiol. 58(8) :2360-7 ; Motlagh A. *et al.*, 1994, Lett. Appl. Microbiol. 18(6) :305-12), de la sakacine P : SppT (Huhne K. *et al.*, 1996, Microbiology. 142(Pt 6) :1437-48), de la sakacine A : SapT (Axelsson L. *et al.*, 1995, J. Bacteriol. 117(8) :2125-37) et de la mésentéricine Y105 : MesD (Fremaux C. *et al.*, 1995, Microbiology. 141(Pt 7) :1637-45).

EXEMPLE 3 :

Spectre d'inhibition.

La sensibilité à la Sakacine G de 17 souches bactériennes a été testée par 30 la méthode de test en puits (cf Matériels et Méthodes). Les résultats sont présentés dans le tableau 1 ci-après :

TABLEAU 1

	Rayon des halos d'inhibition (mm)
<i>Lc. lactis</i> ATCC11454	0
<i>Ln. Paramesenteroides</i> DSM 20288	0
<i>Ln. Mesenteroides</i> DSM 20484	0
<i>Ln. Mesenteroides</i> DSM 20240	0
<i>Lb. delbrueckii</i> DSM 20081	0
<i>Lb. plantarum</i> DSM 20174	0
<i>Lb. brevis</i> DSM 20054	0
<i>Lb. casei</i> DSM 20011	0
<i>Lb. sakei</i> 2515	1
<i>P. acidilactici</i> ENSAIA 583	0
<i>P. cerevisiae</i> IP 5492	1
<i>E. faecium</i> ENSAIA 631	0
<i>E. faecalis</i> IP 5430	2
<i>E. faecalis</i> ENSAIA 636	1
<i>E. durans</i> ENSAIA 630	2
<i>L. innocua</i> 8811	3
<i>L. ivanovi</i> BUG 496	6

5 Le spectre d'inhibition de cette bactériocine apparaît comme assez étroit et limité aux souches de *Lactobacillus sakei* et *Pediococcus cerevisiae* pour les bactéries lactiques. Ce peptide apparaît, comme les autres bactériocines de classe IIa, actif contre toutes les souches de *Listeria* testées, ainsi que contre les *Enterococcus faecalis* et *durans* mais pas contre *Enterococcus faecium*.

REVENDICATIONS

1. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactériocine, dénommée Sakacine G, issue de *Lactobacillus sakei* 2512.
- 5 2. Polypeptide isolé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactériocine de classe IIa.
3. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N° 2 et/ou la séquence ID N° 4.
- 10 4. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°12.
5. Acide nucléique comprenant une séquence nucléotidique codant un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4.
- 15 6. Acide nucléique selon la revendication 5, comprenant la séquence ID N°1 et/ou la séquence ID N°3.
- 20 7. Acide nucléique selon la revendication 5 ou 6, comprenant la séquence d'acide nucléique SEQ ID N°9.
8. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°6.
- 25 9. Polypeptide isolé, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence ID N°8.
10. Acide nucléique comprenant la séquence ID N°5.
- 30 11. Acide nucléique comprenant la séquence ID N°7.

12. Vecteur de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 7, 10 ou 11.

5 13. Cellule hôte transformée par un vecteur selon la revendication 12.

14. Cellule hôte selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'un microorganisme choisi parmi les *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Escherichia* ou d'une levure.

10 15. Procédé de production d'un polypeptide recombinant dans lequel un vecteur comprenant un acide nucléique selon l'une des revendications 5 à 7, 10 ou 11 est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture des conditions permettant l'expression d'un polypeptide selon l'une des revendications 1 à 4, 8
15 ou 9 ou d'un polypeptide codé par une séquence d'acide nucléique telle que définie dans l'une des revendications 5 à 7, 10 ou 11.

20 16. Utilisation d'un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 comme agent actif contre des flores pathogènes ou indésirables dans la préparation de produits alimentaires.

25 17. Utilisation selon la revendication 16, caractérisée en ce que ledit polypeptide est mis en œuvre pour inhiber la croissance et la propagation de *Listeria*, plus particulièrement de *Listeria monocytogenes*, dans les produits alimentaires.

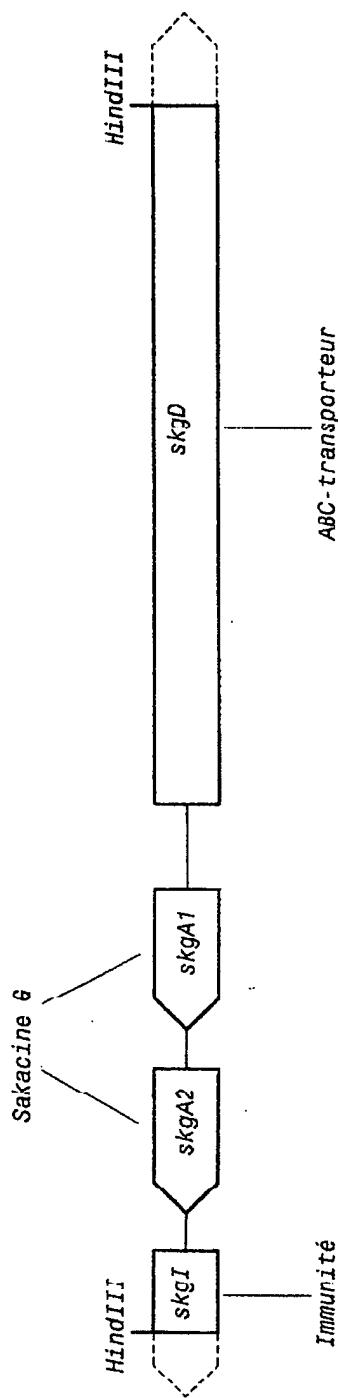
18. Utilisation selon la revendication 16 ou 17, caractérisée en ce que ledit polypeptide est produit dans le produit alimentaire à partir de la souche *Lactobacillus Sakei 2512*.

19. Utilisation de la souche *Lactobacillus Sakei* 2512 dans des produits alimentaires pour y produire un polypeptide bactériocine selon l'une des revendications 1 à 4.

5 20. Composition bactériocine caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un polypeptide selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 ou la souche de *Lactobacillus Sakei* 2512.

2809404

1/1



LISTE DE SEQUENCES

<110> RHODIA FOOD

<120> BACTERIOCINE ANTI-LISTERIA

<130> BFF00/0609

<140>
<141>

<160> 12

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1
<211> 196
<212> ADN
<213> Lactobacillus sake<220>
<221> CDS
<222> (20)...(187)<400> 1
ttaacaggag gtattcaaa atg aag aat aca cgt acg tta acg atc caa gaa 52
Met Lys Asn Thr Arg Ser Leu Thr Ile Gln Glu
1 5 10ata aaa tcc atc aca ggt ggt aaa tac tat ggt aat ggt gtt acg tgt 100
Ile Lys Ser Ile Thr Gly Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys
15 20 25aac tct cat ggt tgt tca gta aat tgg ggg caa gca tgg act tgt ggg 148
Asn Ser His Gly Cys Ser Val Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly
30 35 40gta aat cat cta gct aat ggc ggt cat ggg gtt tgt taa ttattnaa 196
Val Asn His Leu Ala Asn Gly Gly His Gly Val Cys
45 50 55<210> 2
<211> 55
<212> PRT
<213> Lactobacillus sake<400> 2
Met Lys Asn Thr Arg Ser Leu Thr Ile Gln Glu Ile Lys Ser Ile Thr
1 5 10 15Gly Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys Asn Ser His Gly Cys
20 25 30Ser Val Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly Val Asn His Leu Ala
35 40 45Asn Gly Gly His Gly Val Cys
50 55

<210> 3
 <211> 196
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake

 <220>
 <221> CDS
 <222> (20)..(187)

 <400> 3
 taatttggag atgttcttt atg aaa aac gca aaa agc cta aca att caa gaa 52
 Met Lys Asn Ala Lys Ser Leu Thr Ile Gln Glu
 1 5 10

atg aaa tct att aca ggt ggt aaa tac tat ggt aat ggc gtt agc tgt 100
 Met Lys Ser Ile Thr Gly Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys
 15 20 25

aac tct cac ggc tgt tca gta aat tgg ggg caa gca tgg act tgt gga 148
 Asn Ser His Gly Cys Ser Val Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly
 30 35 40

gta aac cat cta gct aat ggc ggt cat gga gtt tgt taa ttaccagat 196
 Val Asn His Leu Ala Asn Gly Gly His Gly Val Cys
 45 50 55

<210> 4
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus sake

 <400> 4
 Met Lys Asn Ala Lys Ser Leu Thr Ile Gln Glu Met Lys Ser Ile Thr
 1 5 10 15

 Gly Gly Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys Asn Ser His Gly Cys
 20 25 30

 Ser Val Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly Val Asn His Leu Ala
 35 40 45

 Asn Gly Gly His Gly Val Cys
 50 55

<210> 5
 <211> 181
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake

 <220>
 <221> CDS
 <222> (24)..(179)

 <400> 5
 ttaaaaaaagg agacgtgatt aaa atg gca aac aaa gac aat att aaa act gaa 53
 Met Ala Asn Lys Asp Asn Ile Lys Thr Glu
 1 5 10

tct aaa aac aac atc gaa gct ctc ttg cac tta cta gaa aag cgt cct 101
 Ser Lys Asn Asn Ile Glu Ala Leu Leu His Leu Leu Glu Lys Arg Pro
 15 20 25

gta aaa tcc agt gaa tta ctc gat att att gac gtt ctt tcc caa gtt 149
 Val Lys Ser Ser Glu Leu Leu Asp Ile Ile Asp Val Leu Ser Gln Val
 30 35 40

tat agc aaa att gat ata gct aag aat ccc ga 181
 Tyr Ser Lys Ile Asp Ile Ala Lys Asn Pro
 45 50

<210> 6
 <211> 52
 <212> PRT
 <213> Lactobacillus sake

<400> 6
 Met Ala Asn Lys Asp Asn Ile Lys Thr Glu Ser Lys Asn Asn Ile Glu
 1 5 10 15

Ala Leu Leu His Leu Leu Glu Lys Arg Pro Val Lys Ser Ser Glu Leu
 20 25 30

Leu Asp Ile Ile Asp Val Leu Ser Gln Val Tyr Ser Lys Ile Asp Ile
 35 40 45

Ala Lys Asn Pro
 50

<210> 7
 <211> 1203
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake

<220>
 <221> CDS
 <222> (20)..(1201)

<400> 7
 aaatttaggag acttatata ttg ttt aat ctg ttg aga tac aaa aaa lta tat 52
 Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr
 1 5 10

tgt tca caa gtg gat gaa gat gat tgt gga atc gca gct ttg aat atg 100
 Cys Ser Gln Val Asp Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met
 15 20 25

att ttt aaa aat ttt ggt tcc gaa tat tca cta tca aaa lly cga ttc 148
 Ile Phe Lys Asn Phe Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe
 30 35 40

tta gca aaa acc agt caa caa ggg act act att ttt gga cly ata aag 196
 Leu Ala Lys Thr Ser Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys
 45 50 55

gct gca gag gaa cta aat tta gaa gcg aat gca tta cca gct gat atg 244

Ala Ala Glu Glu Leu Asn Leu Glu Ala Asn Ala Leu Gln Ala Asp Met
 60 65 70 75
 ggc atc ttt aaa gat gaa aat tta atg cta cca atc att gca cat gtt 292
 Gly Ile Phe Lys Asp Glu Asn Leu Met Leu Pro Ile Ile Ala His Val
 80 85 90
 tta aag caa gga aaa gtt ctg cat tac tac gtt gta ttt gat gtt tcg 340
 Leu Lys Gln Gly Lys Val Leu His Tyr Tyr Val Val Phe Asp Val Ser
 95 100 105
 aaa gac ttt tta att att ggt gac cca gac cca aca ata gga att acg 388
 Lys Asp Phe Leu Ile Ile Gly Asp Pro Asp Pro Thr Ile Gly Ile Thr
 110 115 120
 gaa atc tcc aaa aag gat ttt gaa aat gaa tgg acg ggt aat ttc ata 436
 Glu Ile Ser Lys Lys Asp Phe Glu Asn Glu Trp Thr Gly Asn Phe Ile
 125 130 135
 aca ttt tca aaa gga aag aac ttt gtt tca gag aag cag aga aat aac 484
 Thr Phe Ser Lys Gly Lys Asn Phe Val Ser Glu Lys Gln Arg Asn Asn
 140 145 150 155
 agt tta ctc aag ttt att cct att ttg aga cag caa aaa tcc cta ata 532
 Ser Leu Leu Lys Phe Ile Pro Ile Leu Arg Gln Gln Lys Ser Leu Ile
 160 165 170
 ttc tgg ata gct ttc gcc gca ata cta ttg atg ata att agt att gca 580
 Phe Trp Ile Ala Phe Ala Ala Ile Leu Leu Met Ile Ile Ser Ile Ala
 175 180 185
 gga tca ctt ttt tta gaa caa ctt gta gat ata tat ata cca cac aaa 628
 Gly Ser Leu Phe Leu Glu Gln Leu Val Asp Ile Tyr Ile Pro His Lys
 190 195 200
 aat atg gat aca ttg ggg att atc tcg att tgc tta att gga gcc tat 676
 Asn Met Asp Thr Leu Gly Ile Ile Ser Ile Cys Leu Ile Gly Ala Tyr
 205 210 215
 ctt tta cag gcc gta atg acg tat ttt cag aat ttt tta cta act ata 724
 Leu Leu Gln Ala Val Met Thr Tyr Phe Gln Asn Phe Leu Leu Thr Ile
 220 225 230 235
 ttt gga caa aat ctt tct aga aaa att att tta aat tat att aat cac 772
 Phe Gly Gln Asn Leu Ser Arg Lys Ile Ile Leu Asn Tyr-Ile Asn His
 240 245 250
 ctt ttt gaa tta ccc atg tct ttc tca aca cgt aga gtt ggc gaa 820
 Leu Phe Glu Leu Pro Met Ser Phe Ser Thr Arg Arg Val Gly Glu
 255 260 265
 ata gtc tct cgg ttt aca gat gca agc aag att ata gat gct ttg gca 868
 Ile Val Ser Arg Phe Thr Asp Ala Ser Lys Ile Ile Asp Ala Leu Ala
 270 275 280
 agt acg att ttg act ctc ttt tta gat gtt tgg atg ttg gtt aca atc 916
 Ser Thr Ile Leu Thr Leu Phe Leu Asp Val Trp Met Leu Val Thr Ile
 285 290 295
 tca atc gtt ctc gta ttt tta aat aca aag tta ttg atg att tct ctg 964
 Ser Ile Val Leu Val Phe Leu Asn Thr Lys Leu Phe Met Ile Ser Leu

	305	310	315
gta tct ata ccg gtg tac tca gtt ata att tat gcg ttt aaa aat aca			
Val Ser Ile Pro Val Tyr Ser Val Ile Ile Tyr Ala Phe Lys Asn Thr			
320	325	330	
ttt aat ggc ctg aac cat aaa tca atg gaa aat gca gca tta ttg aat			
Phe Asn Gly Leu Asn His Lys Ser Met Glu Asn Ala Ala Leu Leu Asn			
335	340	345	1012
tct gca ata atc gaa aac gta act ggc ata gaa act gta aaa tca tta			
Ser Ala Ile Ile Glu Asn Val Thr Gly Ile Glu Thr Val Lys Ser Leu			
350	355	360	1108
act tca gaa gaa ttt tcc tac aat caa atc act gat aga ttc gaa aat			
Thr Ser Glu Glu Phe Ser Tyr Asn Gln Ile Thr Asp Arg Phe Glu Asn			
365	370	375	1156
ttt ctt aac agt tcc tta cgg tat acg ata gct gac caa gga cag ca			
Phe Leu Asn Ser Ser Leu Arg Tyr Thr Ile Ala Asp Gln Gly Gln			
380	385	390	1203
<210> 8			
<211> 394			
<212> PRT			
<213> Lactobacillus sake			
<400> 8			
Leu Phe Asn Leu Leu Arg Tyr Lys Lys Leu Tyr Cys Ser Gln Val Asp			
1 . . 5 10 15			
Glu Asp Asp Cys Gly Ile Ala Ala Leu Asn Met Ile Phe Lys Asn Phe			
20 25 30			
Gly Ser Glu Tyr Ser Leu Ser Lys Leu Arg Phe Leu Ala Lys Thr Ser			
35 40 45			
Gln Gln Gly Thr Thr Ile Phe Gly Leu Ile Lys Ala Ala Glu Glu Leu			
50 55 60			
Asn Leu Glu Ala Asn Ala Leu Gln Ala Asp Met Gly Ile Phe Lys Asp			
65 70 75 80			
Glu Asn Leu Met Leu Pro Ile Ile Ala His Val Leu Lys Gln Gly Lys			
85 90 95			
Val Leu His Tyr Tyr Val Val Phe Asp Val Ser Lys Asp Phe Leu Ile			
100 105 110			
Ile Gly Asp Pro Asp Pro Thr Ile Gly Ile Thr Glu Ile Ser Lys Lys			
115 120 125			
Asp Phe Glu Asn Glu Trp Thr Gly Asn Phe Ile Thr Phe Ser Lys Gly			
130 135 140			
Lys Asn Phe Val Ser Glu Lys Glu Arg Asn Asn Ser Leu Leu Lys Phe			
145 150 155 160			
Ile Pro Ile Leu Arg Gln Gln Lys Ser Leu Ile Phe Trp Ile Ala Phe			
165 170 175			

Ala Ala Ile Leu Leu Met Ile Ile Ser Ile Ala Gly Ser Leu Phe Leu
 180 185 190
 Glu Gln Leu Val Asp Ile Tyr Ile Pro His Lys Asn Met Asp Thr Leu
 195 200 205
 Gly Ile Ile Ser Ile Cys Leu Ile Gly Ala Tyr Leu Leu Gln Ala Val
 210 215 220
 Met Thr Tyr Phe Gln Asn Phe Leu Leu Thr Ile Phe Gly Gln Asn Leu
 225 230 235 240
 Ser Arg Lys Ile Ile Leu Asn Tyr Ile Asn His Leu Phe Glu Leu Pro
 245 250 255
 Met Ser Phe Phe Ser Thr Arg Arg Val Gly Glu Ile Val Ser Arg Phe
 260 265 270
 Thr Asp Ala Ser Lys Ile Ile Asp Ala Leu Ala Ser Thr Ile Leu Thr
 275 280 285
 Leu Phe Leu Asp Val Trp Met Leu Val Thr Ile Ser Ile Val Leu Val
 290 295 300
 Phe Leu Asn Thr Lys Leu Phe Met Ile Ser Leu Val Ser Ile Pro Val
 305 310 315 320
 Tyr Ser Val Ile Ile Tyr Ala Phe Lys Asn Thr Phe Asn Gly Leu Asn
 325 330 335
 His Lys Ser Met Glu Asn Ala Ala Leu Leu Asn Ser Ala Ile Ile Glu
 340 345 350
 Asn Val Thr Gly Ile Glu Thr Val Lys Ser Leu Thr Ser Glu Glu Phe
 355 360 365
 Ser Tyr Asn Gln Ile Thr Asp Arg Phe Glu Asn Phe Leu Asn Ser Ser
 370 375 380
 Leu Arg Tyr Thr Ile Ala Asp Gln Gly Gln
 385 390

<210> 9
 <211> 4094
 <212> ADN
 <213> Lactobacillus sake

<400> 9
 agcttcggga ttcttagcta tatcaatttt gctataaact tggaaaagaa cgtcaataat 60
 tcgaaggccct aagaatcgat atagttaaa cgtatgttgc accctttttt gcagtttata 120
 atcgatgtat tcaatggatt ttacatggatc cttttttttt aagtgcagaaga gagtttcgtat 180
 tagcttcattt aatgtccctgc gaaaagatca ttccatgttct ctcgaagctt 240
 gttgtttttt gatttcgtttt taatattgtc tttgttttgc atttttatca cgtttttttt 300
 caacaaaaat ctaagtcaaa attataacag aaacaaacgg taaaatttagt gcagaggaaa 360
 tttatagtaa taaaaaaaaac acaatataat tagtgctttt ttatcttgcattttttttt 420
 aaatatcatt attttttttg tggtaattttt atccacggaaa aatagaccat taattttttg 480
 tccatgaccg ccatttagcta gatggtttac tccacaagtc catgttgcc cccaaatttac 540
 aggtactggc ggtaatcgat ctaccaaatg aggtgttcaag gtacgaacgg gggtaaatg 600

<210> 10
<211> 20
<212> ADN
<213> Lactobacillus sake

<400> 10
aartattatg gmaayggngt

20

<210> 11
<211> 20
<212> ADN
<213> Lactobacillus sake

<400> 11
acatgatgnc cncrcrttngc

20

<210> 12
<211> 37
<212> PRT
<213> Lactobacillus sake

<400> 12
Lys Tyr Tyr Gly Asn Gly Val Ser Cys Asn Ser His Gly Cys Ser Val
1 5 10 15
Asn Trp Gly Gln Ala Trp Thr Cys Gly Val Asn His Leu Ala Asn Gly
20 25 30
Gly His Gly Val Cys
35

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- Le demandeur a maintenu les revendications.
- Le demandeur a modifié les revendications.
- Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

N° d'enregistrement national : 00 13407

N° de publication :

2809404

1. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA DREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	
2. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL	
<p>HUGAS M ET AL: "Application of the bacteriocinogenic <i>Lactobacillus sakei</i> CTC494 to prevent growth of <i>Listeria</i> in fresh and cooked meat products packed with different atmospheres" FOOD MICROBIOL., vol. 15, 1998, pages 639-650, XP000982835 ISSN: 0021-8847</p> <p>AXELSSON L ET AL: "THE GENES INVOLVED IN PRODUCTION OF AND IMMUNITY TO SAKACIN A, A BACTERIOCIN FROM LACTOBACILLUS SAKE LB706" JOURNAL OF BACTERIOLOGY, US, WASHINGTON, DC, vol. 177, no. 8, 1 avril 1995 (1995-04-01), pages 2125-2137, XP000673873 ISSN: 0021-9193</p> <p>HUEHNE KATHRIN ET AL: "Analysis of the sakacin P gene cluster from <i>Lactobacillus</i> <i>sake</i> Lb674 and its expression in sakacin-negative <i>Lb. sake</i> strains." MICROBIOLOGY (READING), vol. 142, no. 6, 1996, pages 1437-1448, XP000982832 ISSN: 1350-0872</p>	
3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	